

基板固定された生体高分子に対する 二次元蛍光寿命相関分光法の適用

¹埼玉大院理工, ²理研・田原分子分光, ³理研・光量子工学

○長谷川一途^{1,2}, 石井邦彦^{2,3}, 田原太平^{2,3}

Application of two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy to immobilized biomolecules

○Kazuto Hasegawa^{1,2}, Kunihiro Ishii^{2,3}, Tahei Tahara^{2,3}

¹Department of Chemistry, Saitama University, Japan

²Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN, Japan

³RIKEN Center for Advanced Photonics, Japan

【Abstract】 Two dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (2D FLCS) is a new method of single-molecule measurements, which enables us to observe structural dynamics of biomolecules in the microsecond time region. In 2D FLCS, however, the observation time window has been limited to several milliseconds because of the translational diffusion of the molecules. In the last JSMS meeting, we reported development of scanning 2D FLCS in which we applied 2D FLCS to immobilized molecules on a glass substrate by scanning sample stage in order to extend the observation time window. In this presentation, we report an attempt of application of 2D FLCS to individual single molecules through determining the position of immobilized molecules for further extending the observation time window. Structural dynamics of Holliday junction (HJ), which contains four arms of double stranded DNA, was studied by using these two methods and results are compared.

【序】 生体機能の発現機構の解明には生体分子の静的な構造を知るだけでなく、その構造が時間変化する様子を捉えることが重要である。近年、生体分子の自発的な構造変化を観測するための手法として一分子計測法が発展している。当研究グループでは、従来の一分子計測法では観測することが困難であったマイクロ秒からミリ秒スケールの速い構造ダイナミクスを捉えることができる新規の一分子計測法として二次元蛍光寿命相関分光法(2D-FLCS)を開発した[1]。しかし、溶液中では並進拡散運動の影響でミリ秒より遅いダイナミクスは観測不可能であった。そこで我々は基板上に固定化された測定対象分子に対して 2D-FLCS を適用することを目指している。昨年 of 討論会ではステージを連続的に走査しながら測定を行う走査型 2D-FLCS を報告した[2]。今回我々は固定化された個々の分子の位置を決定することにより、正確に単一の分子から蛍光を計測するシステムを構築した。2D-FLCS を本手法に適用することで、さらに観測時間領域が延長されるとともに、分子毎の不均一性の情報が得られると期待される。

【方法 (実験・理論)】 高繰り返しパルス光源(Fianium sc-400-4)及び時間相関光子計数装置(Becker&Hickl SPC-130 EM)を用いた従来の 2D-FLCS 測定装置に加え、顕微鏡の試料部にピエゾステージ(ナノコントロール B16-055)を設置した走査型 2D-FLCS 測定装置を使用した[2]。試料を固定した基板を 1 $\mu\text{m/s}$ の速度で走査することで得られた光子列データより作成したラスタ画像(Fig.2(a))から、分子の位置を特定しステー

ジを対象分子の位置に合わせ計測した。測定対象として DNA 四本鎖により形成され、 Mg^{2+} 濃度に依存してダイナミクスの時間スケールが変化する Holliday junction を使用した (Fig.1)[3]。FRET 色素対である Atto532 及び Atto647, 基板固定化用のビオチンをそれぞれ標識した相補的な四本の DNA 鎖をアニーリングし、ビオチン-アビジン相互作用を介して固定し測定を行った。試料の非特異的な吸着を防ぐために、カバーガラス基板をポリエチレングリコール(PEG)で被覆し、PEG の一部はビオチン化されたものを用いた。

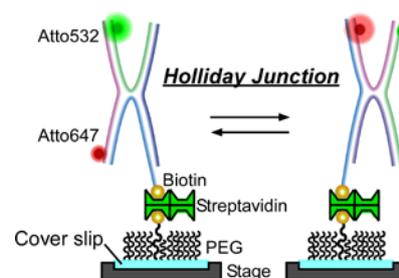


Fig. 1. Schematic illustration of immobilized Holliday junction on glass substrate.

【結果・考察】 Fig.2(b)に $MgCl_2$ 1 mM, 10 mM における一分子 FRET 計測の結果を示す。10 mM においては FRET に由来するドナー(緑線), アクセプター(赤線)の蛍光強度の変化が観測され, 1 mM においては蛍光強度の変化は観測されなかった。Fig.2(c)に Fig.2(b)で示した一分子 FRET 計測より得られた光子列データから算出したドナー, アクセプターの自己相関関数及び相互相関関数を示す。1 mM では数 10 マイクロ秒, 10 mM では約 100 ミリ秒においてそれぞれドナー(緑線)及びアクセプター(赤線)の自己相関の減衰に伴って相互相関(黒線)の立ち上がりが観測され, 実際にダイナミクスの時間スケールが Mg^{2+} 濃度に依存することが確認された[3]。この結果から, Fig.2(b)の 1 mM の場合にはダイナミクスがビンニング幅の 50 ms より速いために蛍光強度変化が観測されなかったと考えられる。

Fig.2(d)には連続的なステージ走査によって得られた自己相関関数及び相互相関関数を示す。Fig.2(c)の結果と比べるとダイナミクスの時間スケールは一致しており, 走査型では一分子 FRET 計測と同様に一分子レベルでの計測が可能であり, 長時間積算(5-10 時間)によりマイクロ秒の時間領域においても低ノイズでの計測が可能であることが示された。一方, 一分子 FRET 計測では観測時間領域が走査速度に依存することなく, 走査型では計測困難な 100 ミリ秒以降の時間領域においても計測可能であるという知見を得ることに成功した。ポスター発表ではこれらのデータの 2D-FLCS の解析結果も合わせ, ダイナミクスの詳細及び基板固定系 2D-FLCS の今後の可能性について議論する。

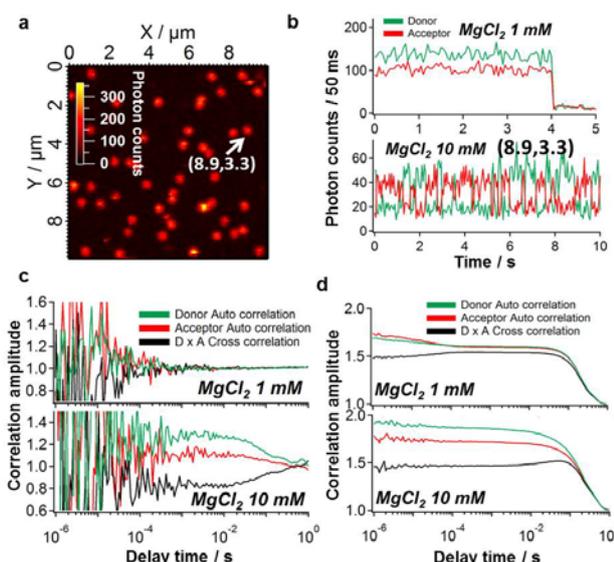


Fig. 2. (a) Raster image of immobilized HJ for smFRET measurement at 10 mM $MgCl_2$. (b) FRET time traces obtained for individual HJ molecules. (c) Auto correlation and cross correlation of donor and acceptor obtained for individual HJ molecule. (d) Auto correlation and cross correlation of donor and acceptor obtained by scanning FCS.

【参考文献】

- [1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414-11422; 11423-11432 (2013).
- [2] 長谷川, Vaidya, 石井, 田原, 第11回分子科学討論会, 4P076(2017).
- [3] M. Pirchi, et al., *J. Phys. Chem. B* **120**, 13065-13075 (2016).